

UNIVERSITÉ DE PARIS-V - RENÉ DESCARTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN - PORT-ROYAL

Année 1973

1974

N°

36

# THÈSE

pour le  
DOCTORAT EN MÉDECINE  
(Diplôme d'État)

par

**HOANG THI Huong Thao**

Née le 20 Juillet 1946, à Vinh (Vietnam)

Présentée et soutenue publiquement le

1974

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES CHRONIQUES :  
ÉTUDE DES MODIFICATIONS DU COMPORTEMENT IN VITRO  
DES CELLULES FORMATRICES DE COLONIES EN AGAR,  
AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA MALADIE.

Président : Mr. G. MATHÉ, Professeur.

DUPUYTREN - COPY  
9, Rue Dupuytren  
PARIS (6°)

1973



UNIVERSITÉ DE PARIS-V - RENÉ DESCARTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN - PORT-ROYAL

---

Année 1973

N°

# THÈSE

pour le  
DOCTORAT EN MÉDECINE  
(Diplôme d'État)

par  
**HOANG THI Huong Thao**

Née le 20 Juillet 1946, à Vinh (Vietnam)

---

*Présentée et soutenue publiquement le*

---

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES CHRONIQUES :  
ÉTUDE DES MODIFICATIONS DU COMPORTEMENT IN VITRO  
DES CELLULES FORMATRICES DE COLONIES EN AGAR,  
AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA MALADIE.**

---

Président : Mr. G. MATHÉ, Professeur.

---

DUPUYTREN - COPY  
9, Rue Dupuytren  
PARIS (6°)

1973

UNIVERSITÉ DE PARIS-V - REINE DESCARTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN - PORT-ROYAL

N°

Année 1975

# THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

HOANG THI HUONG THAO

née le 20 juillet 1949, à West-Vladivostok

Présentée et soutenue publiquement le



CONTRIBUTION À L'ÉTUDE

DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES CHRONIQUES :

ÉTUDE DES MODIFICATIONS DU COMPORTEMENT IN VITRO

DES CELLULES FORMATRICES DE COLONIES EN ACAR

AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA MALADIE.

Président : Mr. G. MATHÉ, Professeur.

DUPUYTREN - COYU

9, Rue Dupuytren

PARIS (6<sup>e</sup>)

1975

A MES PARENTS,

En témoignage de ma  
grande affection filiale.

A MON MARI

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS



A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE,

Monsieur le Professeur G. MATHE  
Professeur de Cancérologie expérimentale

En témoignage de notre  
respectueuse reconnaissance.



A Monsieur le Docteur P. POUILLART



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

A Monsieur le Professeur L. SCHWARZENBERG

En témoignage de mon respectueux attachement.



A Monsieur le Professeur MILLIEZ

A Monsieur le Professeur H. BRICAIRE

A Monsieur le Professeur BOUE<sup>'</sup>

En témoignage de respect  
et de reconnaissance pour  
leur enseignement.



A Monsieur le Professeur H. RAPPAPORT

A Monsieur le Professeur M. SCHNEIDER

A Madame E. BRUGERIE

Au Personnel de l'Unité FRED SIGUIER,  
à l'Hôpital Paul Brousse.



## DES LEUCENIES MYELOIDES CHRONIQUES :

ETUDE DES MODIFICATIONS DU COMPORTEMENT IN VITRO  
DES CELLULES FORMATRICES DE COLONIES EN AGAR,  
AU COURS DE L'EVOLUTION DE LA MALADIE.

```

      *
     **
    ***
   ****
  *****
 *****
*****
*****
 *****
  *****
   ****
    ***
     **
      *

```



## I N T R O D U C T I O N

---

Dans le cadre très large des hémopathies malignes, la leucémie myéloïde chronique occupe une place à part. Cette position est en rapport aussi bien avec son évolution clinique particulière, qu'avec la complexité des phénomènes cellulaires intriqués qui la définissent.

Son évolution clinique permet de décrire deux phases successives : une phase régulière et chronique, et une phase aiguë terminale très différente, et qui reste toujours inaccessible aux moyens thérapeutiques. Les progrès multiples dans ce domaine, depuis vingt ans, n'ont pas permis de modifier cette évolution, ni même de prolonger significativement la survie.

Les études cinétiques réalisées depuis une dizaine d'années ont permis de décrire quelques anomalies de maturation et de proliférations systématisées, mais qui semblent sous la dépendance des facteurs réguliers de contrôle de l'hématopoïèse plus ou moins adaptés à une situation cellulaire nouvelle.

La cytogénétique, en démontrant la présence d'un marqueur chromosomique (Ph 1) dans les cellules de la lignée granuleuse et celles des deux autres lignées myéloïdes, indique le niveau de l'anomalie cellulaire initiale et laisse suggérer la possibilité d'une évolution clonale.

Le but de ce travail a été de préciser la progression de l'altération des cellules souches circulantes des sujets atteints de leucémie myéloïde chronique, et de comparer cette anomalie cellulaire aux modifications des facteurs sériques de régulation de l'hématopoïèse et des facteurs cellulaires libérés par les éléments circulants.

---

## <sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>2</sup> G E N E R A L I T É S

---

La leucémie myéloïde chronique se traduit essentiellement par une prolifération considérable de la lignée granuleuse, mais aussi par des anomalies des lignées érythrocytaire (anémie, érythroblastes circulants) et plaquettaire (thrombopathie, thrombopénie ou thrombocytose). Ainsi, dans le schéma actuel de l'hématopoïèse, la maladie semble atteindre une cellule jeune, la CFU-S (Colony forming unit dans la rate), cellule souche myéloïde, dont l'étude ne peut se faire que sur un modèle animal, notamment la souris, qui présente au niveau de la rate des conditions locales aptes à la formation des colonies.

### La CFU-S

TILL et Mac CULLOCH (1961) ont décrit une méthode pour la détection de certaines cellules souches hématopoïétiques : les cellules spléniques ou médullaires de souris injectées par voie intraveineuse à des souris isogéniques, irradiées à dose létale, donnent naissance à des colonies dans la rate, visibles à l'oeil nu au neuvième jour.

Plusieurs arguments montrent que chaque colonie provient d'une seule cellule souche, la CFU/S.

Il existe une relation linéaire entre le nombre de cellules injectées et le nombre de colonies dans la rate, au neuvième jour.

Si on crée des lésions chromosomiques dans les cellules injectées, toutes les cellules d'une même colonie portent la même anomalie chromosomique (WU and al., 1968).

Chaque colonie est constituée d'une population pure érythrocytaire, granulocytaire ou mégacaryocytaire. Pour une même lignée d'animaux et dans des conditions physiologiques identiques, il existe un rapport constant entre les trois types de colonies.

La CFU/S est multipotente, car les colonies pures, en vieillissant, deviennent mixtes ; en plus, les cellules d'une colonie pure, réinjectées à des souris isogéniques irradiées, donnent naissance à des colonies dans la rate de différents types, érythrocytaire, agranulocytaire et mégacaryocytaire. On n'observe jamais de colonie lymphocytaire.

Les facteurs conditionnant la prolifération et la différenciation de ces cellules souches hématopoïétiques sont d'origine sérique : ainsi, la présence dans le sérum d'un excès d'érythropoïétine aboutit à l'augmentation du rapport des colonies érythrocytaires aux colonies myélocytaires et mégacaryocytaires.

De telles expériences in vivo ne sont réalisables que chez les petits rongeurs où la rate est hématopoïétique.

Ainsi, cette technique d'exocolonisation dans la rate permet d'isoler une cellule souche à l'origine des trois lignées myéloïdes érythrocytaire, granulocytaire et plaquettaire.

#### La CFU/a

La mise au point, par PLUZNICK et SACHS, en 1965, puis BRADLEY et METCALF, en 1966, d'une technique de culture en agar des cellules souches hématopoïétiques permet de franchir un pas supplémen-

taire dans l'étude de l'hématopoïèse.

L'obtention des colonies en agar nécessite la mise en contact, dans des conditions d'environnement précises, de cellules médullaires et d'un facteur de stimulation présent dans divers liquides et tissus biologiques. Au 7ème-10ème jour, quand toutes les conditions de culture ont été réunies, apparaissent des colonies, parfois visibles à l'oeil nu. Morphologiquement, les colonies sont de trois types :

1)- Colonies denses, dont l'étude cytologique montre la présence de granulocytes à divers stades de la maturation. (FIGURE 1).

2)- Amas denses entourés d'un halo de cellules dispersées. La cytologie montre la présence de cellules granulocytaires et monocytaires. (FIGURE 2).

3)- Amas de grandes cellules dispersées de type macrophagique. (FIGURE 3). Ces cellules présentent un noyau excentré, un cytoplasme souvent très vacuolé, et phagocytent des particules d'encre de Chine.

Le nombre de colonies granuleuses par rapport aux colonies macrophagiques varie avec le vieillissement de la culture : les colonies granuleuses sont remplacées au fur et à mesure par des colonies mixtes, puis macrophagiques.

On n'observe pas de colonies mégacaryocytaire et lymphocytaire.

Chaque colonie en agar dérive-t-elle d'une seule CFU/a ?

La preuve apportée est d'abord indirecte ; le nombre de colonies varie en fonction linéaire avec le nombre de cellules mises en culture, et par extrapolation la courbe passe par l'origine.

Puis, dernièrement, par la technique de séparation de cellules en gradient d'albumine, l'équipe de DICKE et Van BEKKUM a pu isoler une population pure de cellules souches poussant en agar, et prouver expérimentalement qu'une CFU/a correspond à une colonie.

Ainsi, cette technique permet d'étudier la cellule souche de la lignée granulocytaire et monocyttaire.

Il se pose le problème de l'identité de la CFU/a, la relation entre CFU/a et CFU/S :

- METCALF a démontré par gradient continu en albumine que les CFU/a et les CFU/S présentent des densités différentes.

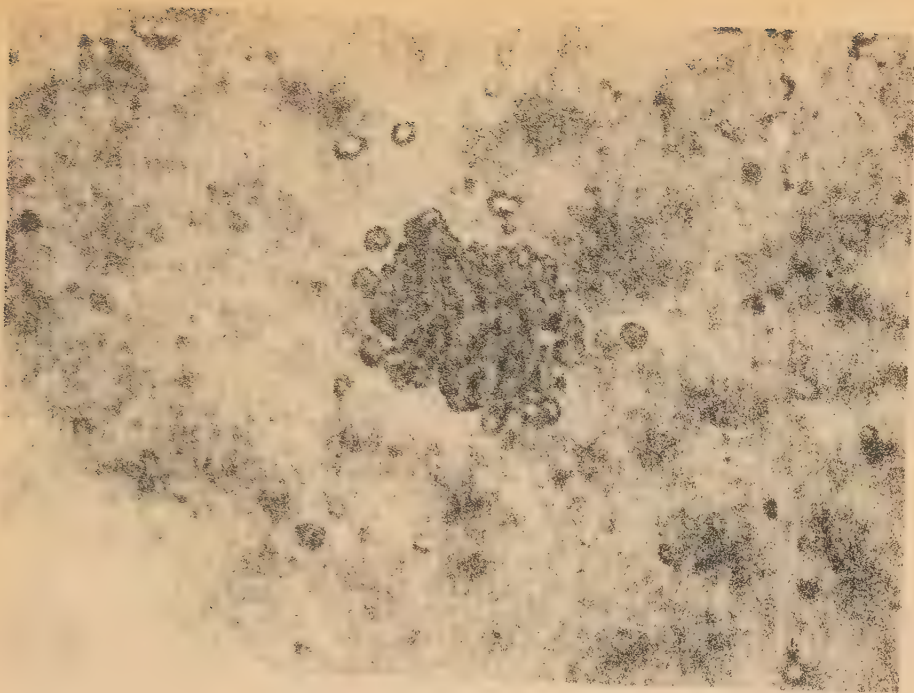
- Dans certaines conditions de culture, le nombre de CFU/a augmente, alors que le nombre de CFU/S diminue.

- Après l'épreuve suicide par la thymidine tritiée, la diminution du nombre de CFU/a est plus importante que celle des CFU/S.

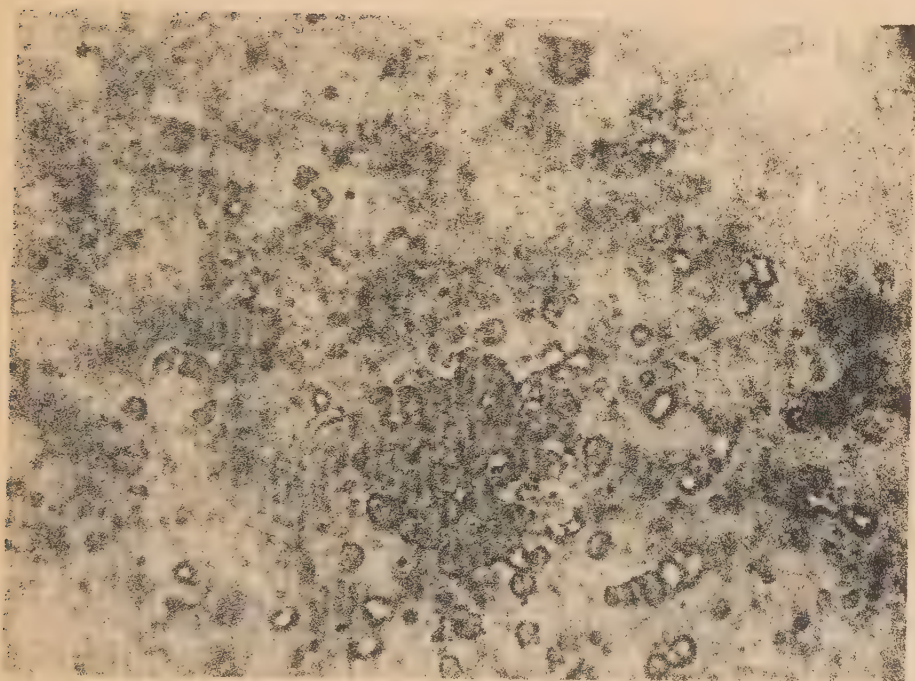
Cependant, il existe un rapport constant entre le nombre de CFU/a et le nombre de CFU/S, dans une colonie prélevée sur la rate au 14ème jour chez une même lignée de souris.

En plus, une anomalie chromosomique radio-induite est retrouvée à la fois dans les cellules de colonies dans la rate et celles des colonies en agar.

La preuve directe de la provenance de CFU/a à partir de CFU/S n'est pas encore apportée, mais on admet à l'heure actuelle que la CFU/S donne naissance à des CFU/a et que les CFU/a sont dans le cycle, alors que les CFU/S sont pour la plupart en phase de repos.

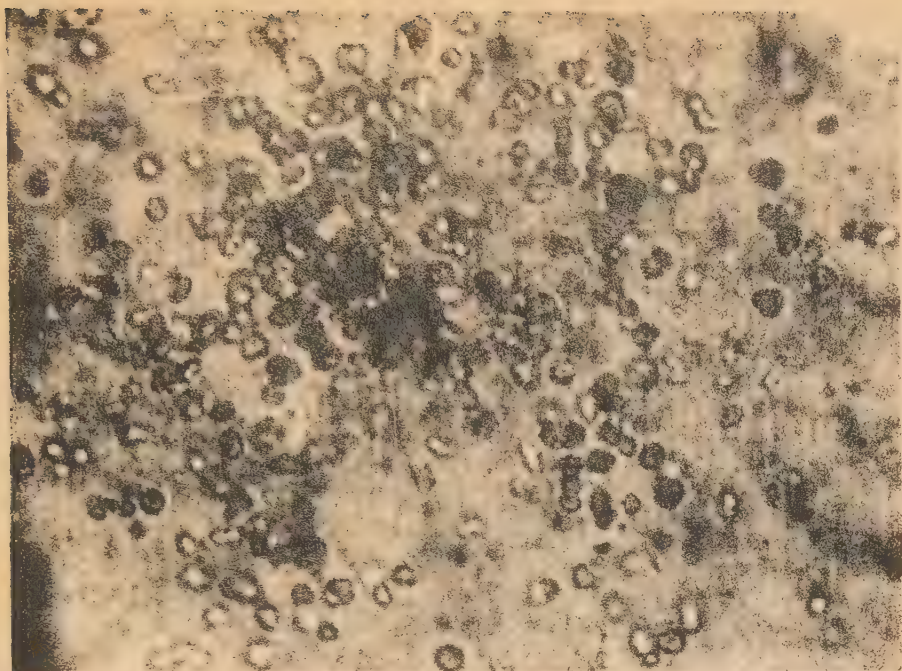


COLONIE DE TYPE GRANULEUX  
FIGURE I

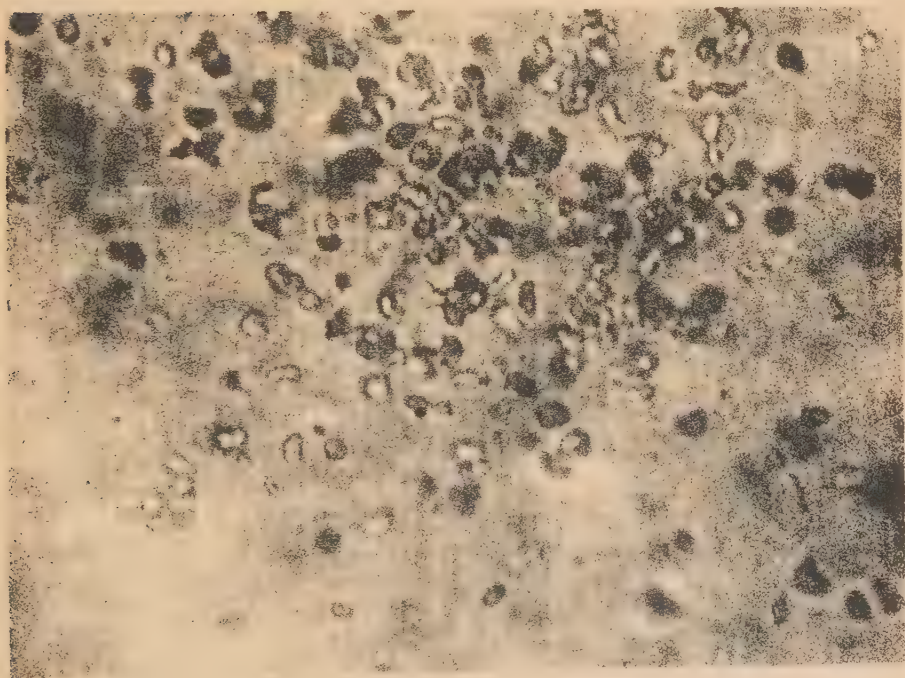


COLONIE MIXTE  
FIGURE 2





COLONIES DE TYPE MACROPHAGIQUE





### Le facteur de stimulation

Initialement, les expériences de culture de cellules médullaires de souris ont montré que la présence d'un facteur de stimulation est indispensable pour la prolifération et la maturation des colonies en agar. Ce facteur appelé CSF (Colony stimulating factor) est apporté :

- soit par une couche de cellules nutritives mises en culture au-dessous de la couche de croissance des cellules souches (PLUZNIK et SACHS - BRADLEY et METCALF). Les cellules étant des leucocytes (ROBINSON), des cellules embryonnaires (CARBONE), des cellules spléniques (PARAN), des fibroblastes humains (DICKE), des cellules de tubules rénaux.

- soit par du milieu conditionné obtenu à partir de culture en milieu liquide des mêmes cellules nutritives, ou des extraits de différents tissus (SHERIDAN - METCALF).

- soit par des urines dialysées (METCALF) ou des sérums de souris auxquelles on a injecté préalablement de l'endotoxine.

En fait, l'origine précise du CSF est apportée par MOORE et WILLIAMS : par la technique de séparation de cellules, on obtient des fractions riches en monocytes qui présentent une grande activité stimulante, alors que les fractions riches en polynucléaires en sont dépourvues. Une autre preuve est fournie par GOLDEN-FINLEY-CLINE : les couches nutritives contenant des macrophages ou le milieu conditionné obtenu à partir de ces mêmes cellules possèdent une activité de stimulation considérable. Ces résultats font penser que les monocytes macrophages jouent peut-être un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse par l'intermédiaire du facteur CSF qu'ils sécrètent.

Le CSF ne semble pas être spécifique d'espèce ;

c'est une glycoprotéine de poids moléculaire environ 40.000, de constante de sédimentation 35 - 45.

Pour comprendre le rôle physiologique du CSF, plusieurs expériences ont été réalisées :

- L'injection d'endotoxine de Salmonella Typhi Murium en intra-péritonéale à des souris entraîne une augmentation considérable de 50 à 100 fois, de l'activité de stimulation du sérum.

- Le sérum de souris irradiées montre aussi une augmentation de l'activité stimulante.

De même, on a constaté, chez des malades irradiés pour des raisons thérapeutiques, l'augmentation de l'activité de stimulation du sérum, ainsi que celle de leurs leucocytes circulants.

Une étude systématique des sérums de malades atteints d'affections variées, faite par R. FORSTER et al., montre que l'activité de stimulation varie d'une maladie à l'autre et que cette activité est très augmentée dans le sérum de sujets atteints de maladie virale.

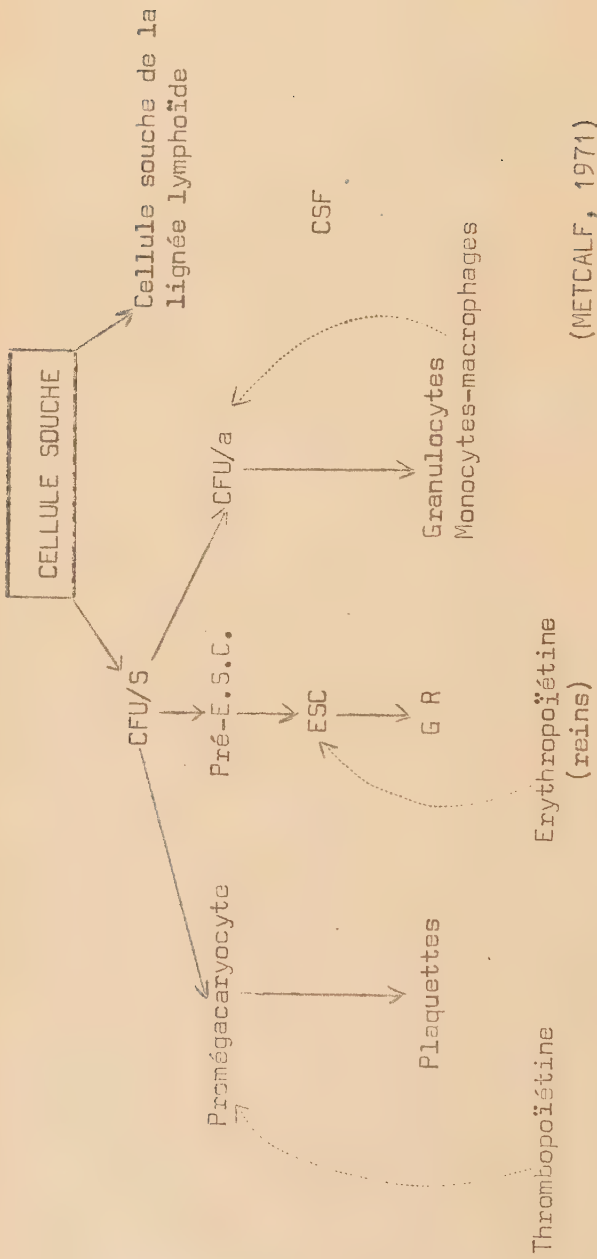
A l'inverse, on a observé la présence d'inhibiteurs dans le sérum de sujet normal et de souris (STANLEY et al. - CHAN et al.). Selon les résultats de METCALF, il existe une diminution des inhibiteurs sériques dans 57 % des cas chez les leucémiques et dans 10 % des cas dans les infections.

On a pu obtenir des inhibiteurs à partir de culture de certaines cellules (ICHIKAWA, PLUZNIK et SACHS, 1967). Le surnageant d'une culture de population pure de granulocytes mûrs inhibe la synthèse de DNA des cellules médullaires de rat (PAUKOVITS).

Cet inhibiteur d'origine granulocytaire est dialysable, de poids moléculaire 5.000, n'est pas

spécifique d'espèce, résistant à la chaleur et à l'éther ; ces propriétés diffèrent de celles des inhibiteurs sériques qui sont des lipoprotéines, labiles à la chaleur, détruites par l'éther, migrant dans les  $\beta$ -globulines.

A partir de toutes les expériences in vivo et in vitro, on peut proposer un schéma de l'hématopoïèse avec le niveau d'action des facteurs sériques de la régulation de l'hématopoïèse.



(METCALF, 1971)

|        |                               |
|--------|-------------------------------|
| CFU/S  | Colony forming Unit / Spleen  |
| E.S.C. | Erythropoietin Sensitive Cell |
| CFU/a  | Colony forming Unit/agar      |

## DEFINITION DU TRAVAIL

---

En appliquant la technique de culture en agar pour l'étude systématique des leucémies aiguës, nous avons constaté, dans notre laboratoire, de même que d'autres équipes, que le nombre de cellules souches en agar par  $2 \cdot 10^5$  cellules médullaires est nul pour les leucémies aiguës lymphoïdes à la phase perceptible, alors qu'il est variable pour les leucémies myéloïdes aiguës : le nombre de CFU/a est diminué ou nul ou augmenté. Il n'en est pas de même pour les leucémies myéloïdes chroniques où le taux de CFU/a reflète l'évolution clinique de la maladie.

Schématiquement, l'évolution de la leucémie myéloïde chronique peut se résumer en trois phases successives :

1 - La phase initiale de la maladie se traduit, dans la majorité des cas, par une splénomégalie révélatrice, avec hyperleucocytose périphérique souvent considérable.

Les autres éléments myéloïdes sont diminués en valeur relative, l'anémie est discrète, les plaquettes sont en nombre normal ou élevé.

La sensibilité au traitement, à cette phase, paraît satisfaisante. Une rémission peut être entretenue pendant une durée variable, en moyenne huit mois, parfois très longue, de deux ans, d'autres fois très courte.

2 - La deuxième phase peut s'annoncer par une résistance relative au traitement habituel, une augmentation de la rate qui devient plus ou moins sensible ; on note alors quelques modifications du

tableau hématologique : présence de quelques blastes circulants, apparition d'une thrombopénie, aggravation de l'anémie, mais le myélogramme ne montre encore qu'un très faible pourcentage de blastes.

3 - La phase terminale est évoquée devant une altération de l'état général, souvent des douleurs spléniques, des adénopathies, l'apparition d'un purpura, l'aggravation de la pâleur. L'hémo-gramme montre une anémie importante, une thrombo-pénie, la persistance de l'hyperleucocytose avec augmentation nette du pourcentage des éléments immatures. Le myélogramme permet de confirmer la prédominance des éléments blastiques avec hiatus leucémique, et de caractériser le type morphologique de la prolifération.

Dans un protocole en cours d'expérimentation, on a essayé d'étudier, chaque fois que cela est possible :

1 - le nombre et la capacité de prolifération des CFU/a dans le sang circulant, leur réponse au facteur de stimulation CSF.

2 - le sérum des malades à la recherche d'une activité stimulante ou inhibitrice sur la formation des colonies en agar à partir de cellules médullaires normales.

3 - l'activité des leucocytes circulants, en ce qui concerne leur éventuel produit de sécrétion (milieu conditionné), ou leur action directe sur la formation des colonies à partir de cellules médullaires normales ou d'autres cellules leucémiques. Dernièrement, on a essayé d'isoler les monocytes normaux et leucémiques, pour comparer leur produit de sécrétion et leur capacité d'adhérence au verre.

## MATERIEL ET METHODES

Les malades entrant dans cette étude sont divisés en trois groupes, selon leur évolution clinique précédemment décrite :

- A la phase régulière, les malades ne reçoivent pas de chimiothérapie depuis au moins quinze jours pour une série de leucophérèses (LMC 1).

- Font partie du groupe 2 (LMC 2) les malades présentant une apparition ou une aggravation de l'anémie, une thrombopénie  $< 100.000$ .

- Dans la phase terminale (LMC 3), les malades étudiés présentent tous plus de 30 % de blastes dans la moelle.

## LES SOURCES DE STIMULATION

1)- La sous-couche nutritive est préparée à partir de leucocytes circulants, soit de sujets normaux (S.C.N.), soit de sujet atteint de leucémie myéloïde chronique (LMC 1 - LMC 2 - LMC 3).

Le sang est recueilli sur héparine sans additif en seringue siliconée. La sédimentation se fait en 2 heures, à la température du laboratoire.

On recueille le surnageant contenant les globules blancs ; le culot de globules rouges est rejeté. La numération est faite au bleu de trypan et la concentration finale de leucocytes dans le milieu de culture sera de  $10^6$  cellules/ml. Ce milieu est constitué de :

0,5 % agar  
M.E.M. (Minimum Essential Medium),  
Sérum embryonnaire de veau 10 % (SEV),  
Trypticase Soja 5 % (T.S.).

On met 2 ml de cette préparation par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, soit  $2 \cdot 10^6$  cellules par boîte. Une couche pour la croissance des cellules souches à étudier sera ajoutée après solidification de cette sous-couche.

2)- Le milieu conditionné (M.C.) est obtenu à partir de culture à court terme de leucocytes normaux ou de LMC. Les globules sont recueillis de la même façon que précédemment ; 5 ml d'une suspension de  $4 \cdot 10^6$  cellules/ml dans du Mac Coy 5 A + 10 % de S.E.V. sont mis dans chaque boîte de Pétri (5cm de diamètre). Les boîtes sont mises à l'étuve à  $37^\circ$  en atmosphère humidifiée, à 10 % de  $CO_2$ . Au bout de 7 jours, le surnageant est recueilli, puis filtré sur millipore 0,45  $\mu$ .

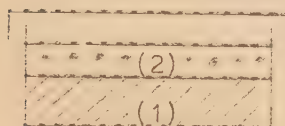
#### PREPARATION DES MONOCYTES-MACROPHAGES

Le sang recueilli sur héparine (200 U/10 ml) est centrifugé à 1.200 tours pendant 5 minutes.

Le surnageant blanc est recueilli et mis dans des tubes de Leighton avec une lamelle, à raison de  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml de Mac Coy 5 A + 10 % de SEV et de 2 ml/tube. Après 6 heures d'incubation à  $37^\circ$ , les cellules non adhérentes au verre sont enlevées, les lamelles lavées trois fois avec du milieu Mac Coy. Les cellules adhérentes sont remises en culture en tube de Leighton dans 1 ml de Mac Coy + SEV (environ  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml) pendant 7 jours à  $37^\circ$ . Le surnageant est ensuite recueilli, filtré sur millipore et conservé à  $-20^\circ C$  pour tester l'activité stimulante.

Chaque  $\mu C$  est ajouté à différentes concentrations : 5 %, 10 % et 20 %, dans la couche de croissance des cellules souches.

# TECHNIQUE DEUX COUCHES



- (1)- Sous-couche :
- ( Agar 0,5 %
  - ( S.E.V. 10 %
  - ( TS 5 %
  - ( MEM 85 %
  - ( Cellules :  $10^6$ /ml

Différentes cellules : Leucocytes normaux  
 Leucocytes ( LMC<sub>1</sub>  
 ( LMC<sub>2</sub>  
 ( LMC<sub>3</sub>

- (2)- Couche de croissance :

Agar 0,3 %  
 S.E.V. 20 %  
 TS 5 %  
 MEM 75 %  
 Cellules :  $2 \cdot 10^5$ /ml

Différentes cellules :

- Cellules médullaires humaines normales
- Cellules médullaires + Sérum LMC  
 = test d'inhibition
- Cellules médullaires de souris
- Leucocytes périphériques LMC

## TECHNIQUE MONOCOUCHE



Agar 0,3 % (idem)

- Pour la détection de colonies spontanées avec des cellules LMC, cellules médullaires humaines normales.
- Test d'activité du CSF : 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml de sérum endotoxine de souris.

### Sérum humain

A chaque prélèvement de globules blancs, un peu de sang est recueilli dans un tube à essai. Après coagulation, le sérum est centrifugé, filtré, puis stocké dans des flacons plastiques à  $-20^{\circ}$  C.

### Sérum de souris endotoxiné

On injecte 10  $\mu$ g d'endotoxine de Salmonella Typhi Murium en intra-péritonéal à des souris (DBA<sub>2</sub> X C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>) F<sub>1</sub> ; 6 heures après, le sang est recueilli par ponction intra-cardiaque. Le sérum ainsi obtenu sert comme CSF de référence.

### Clonage des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules mises pour le clonage en agar proviennent du sang périphérique de LMC ou de moelle osseuse.

La moelle osseuse humaine est obtenue par ponction iliaque avec seringue héparinée et siliconée. Les globules blancs sont recueillis de la même façon que pour le sang.

La moelle osseuse de souris est préparée à partir des F<sub>1</sub> (DBA<sub>2</sub> X C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>). Les souris sont tuées par élongation cervicale. Les cellules médullaires sont aspirées des fémurs et mises en suspension dans du Mac Coy 5A.

Le milieu de culture est composé de :

0,3 % Agar

MEM

S.E.V. 20 %

T.S. 5 %.

On ajoute les cellules médullaires pour une concentration finale de  $2.10^5$  cellules/ml.

1 ml de cette préparation est mis en culture :

- soit sur une sous-couche nutritive ;
- soit directement dans des boîtes de Pétri avec du milieu conditionné ;
- soit, pour les tests d'inhibition, avec 5 %, 10 %, 20 % de sérum, sur une sous-couche normale.

## RESULTATS

Le TABLEAU I montre le nombre de colonies obtenues à partir de  $2.10^5$  cellules circulantes de LMC à différentes phases cliniques, dans des conditions normales de stimulation, c'est-à-dire avec une sous-couche de leucocytes normaux. Pour chaque expérience, des boîtes témoins, sans facteur de stimulation, ont été faites. Le résultat donné est la moyenne d'au moins 5 boîtes pour chaque cas. Les amas de plus de 50 cellules ont été comptés comme colonies ; ceux contenant moins de 50 cellules ont été appelés clusters.

Tous les malades étudiés ont présenté un chromosome Philadelphia dans leur caryotype, avant ou pendant la période où ils ont été prélevés. Le pourcentage de cellules à Ph 1 (+) est variable.

- 9 cas de LMC<sub>1</sub>, c'est-à-dire en phase régulière, ont permis d'obtenir un nombre variable de colonies, de 10 à 576, quand les cellules sont en présence d'un facteur de stimulation normal.

- 3 LMC<sub>1</sub> ont présenté une formation spontanée de colonies ;
- 1 cas n'a présenté que des clusters ;
- Les 5 autres, en absence de facteur de stimulation, n'ont pas donné de colonie.

T A B L E A U    I

CFU/a DANS LE SANG CIRCULANT DE L.M.C.  
A DIFFERENTES PHASES D'EVOLUTION

|                  |    | MALADES | LEUCOCYTES<br>/mm <sup>3</sup> | FORMULE |    |    |    |      | N colonies     |          |
|------------------|----|---------|--------------------------------|---------|----|----|----|------|----------------|----------|
|                  |    |         |                                | PN      | MC | PM | Bl | MONO | non<br>stimulé | S.C.N.   |
| LMC <sub>1</sub> | 1  | D.D.    | 68.000                         | 87      | 1  | 3  | 0  | 2    | 96             | 576      |
|                  | 2  | Cra.    |                                |         |    |    |    |      | 0              | 20       |
|                  | 3  | Gir.    | 190.000                        | 66      | 11 | 15 | 2  | 3    | 0              | 10       |
|                  | 4  | Cr.     | -                              |         |    |    |    |      | 0              | 10       |
|                  | 5  | Mos.    | 285.000                        | 65      | 10 | 19 | 1  | 0    | 0              | 300      |
|                  | 6  | Pe.     |                                |         |    |    |    |      | 0              | 25       |
|                  | 7  | Pon.    | 90.000                         | 68      | 6  | 16 | 4  | 2    | 59             | 77       |
|                  | 8  | Pon.    |                                |         |    |    |    |      | 106            | 210      |
|                  | 9  | Mey.    | 96.000                         | 75      | 5  | 14 | 0  | 2    | Clusters       | 23       |
| LMC <sub>2</sub> | 10 | Rou.    |                                |         |    |    |    |      | 0              | Clusters |
|                  | 11 | Pe.     |                                |         |    |    |    |      | 0              | 2        |
|                  | 12 | Del.D   | 175.000                        |         |    |    | 3  |      | 0              | 10       |
| LMC <sub>3</sub> | 13 | Ren.    | 11.000                         | 31      | 0  | 2  | 8  | 1    | 0              | 0        |
|                  | 14 | Del.D   | 154.000                        | 7       | 0  | 1  | 88 | 1    | 0              | 6        |
|                  | 15 | Pec.    | 300.000                        | 2       | 0  | 0  | 96 | 0    | 0              | 0        |

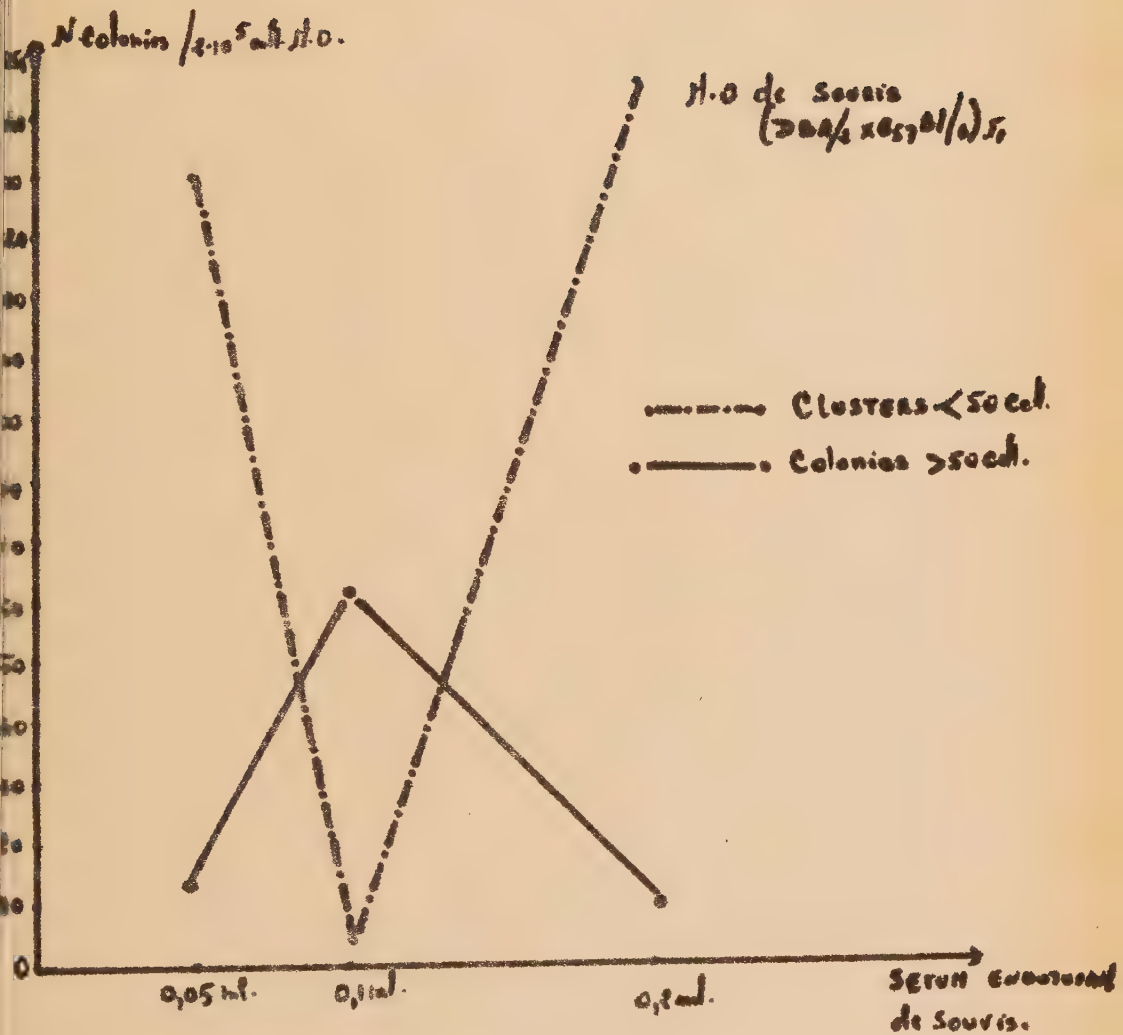
PN = polynucléaire

MC = métamyélocyte

PM = promyélocyte et myélocyte

Bl = blastes

Mono = monocyte



Nombre de colonies et de clusters (< 50 cell.)  
obtenus avec des concentrations variables de  
sérum "endotoxiné" de souris adulte.



- Seulement 3 malades en phase précrise blastique ont pu être étudiés :

- Le nombre de colonies spontanées est nul.

- En présence du facteur de stimulation, le nombre maximum obtenu est de 10.

- 3 malades ont été étudiés en pleine transformation aiguë : celle du malade n° 13 est de type lymphoblastique et myéloblastique, du n° 14 de type monoblastique, et du n° 15 de type lymphoblastique.

Le nombre de colonies avec ou sans facteur de stimulation est peu différent de nul.

Le TABLEAU II montre la capacité de stimulation des leucocytes circulants de LMC à différents stades d'évolution sur la formation de colonies en agar à partir de cellules médullaires normales, ou des cellules circulantes de LMC provenant d'autres malades : dans tous les cas, la stimulation est nulle ou très faible, donnant au maximum 15 colonies pour  $2.10^5$  cellules mises en culture.

Le TABLEAU III : Les mêmes cellules qui ont été mises en culture comme sous-couche sont étudiées pour leur produit de sécrétion : les milieux conditionnés.

Les milieux conditionnés de LMC<sub>1</sub> et de LMC<sub>2</sub> n'ont montré aucune activité stimulante ; par contre, ils inhibent totalement ou à 50 % la capacité de formation de colonies en agar des cellules médullaires humaines normales.

Le TABLEAU IV : Seuls trois sérums de LMC en phase régulière ont pu être testés : ils montrent une forte activité inhibitrice sur la formation des

T A B L E A U     I I

CLONAGE DE LEUCOCYTES PERIPHERIQUES DE LMC,  
DE CELLULES MEDULLAIRES NORMALES HUMAINES  
ET DE SOURIS,  
SUR DIFFERENTES SOUS-COUCHE NUTRITIVES.

| CELLULES<br>CIBLES | S.N.C.          | S.C.L.M.C <sub>1</sub> | S.C.L.M.C <sub>2</sub> |
|--------------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| L.M.C <sub>1</sub> | 156<br>(10-576) | 0                      | 0                      |
| L.M.C <sub>2</sub> | 8<br>(2-10)     | Clusters               | Clusters               |
| L.M.C <sub>3</sub> | 0               | -                      | -                      |
| M.O.N.             | 53<br>(25- 85)  | 15                     | -                      |
| M.O. Souris *      | 51              | 2                      | -                      |

\* Pour les cellules médullaires de souris, le recrutement maximum de CFU/a est obtenu avec 0,1 ml de sérum endotoxiné (62 colonies/2.10<sup>5</sup> cellules).

M.O.N. : moelle osseuse humaine normale.

M.O. Souris : moelle osseuse de souris.

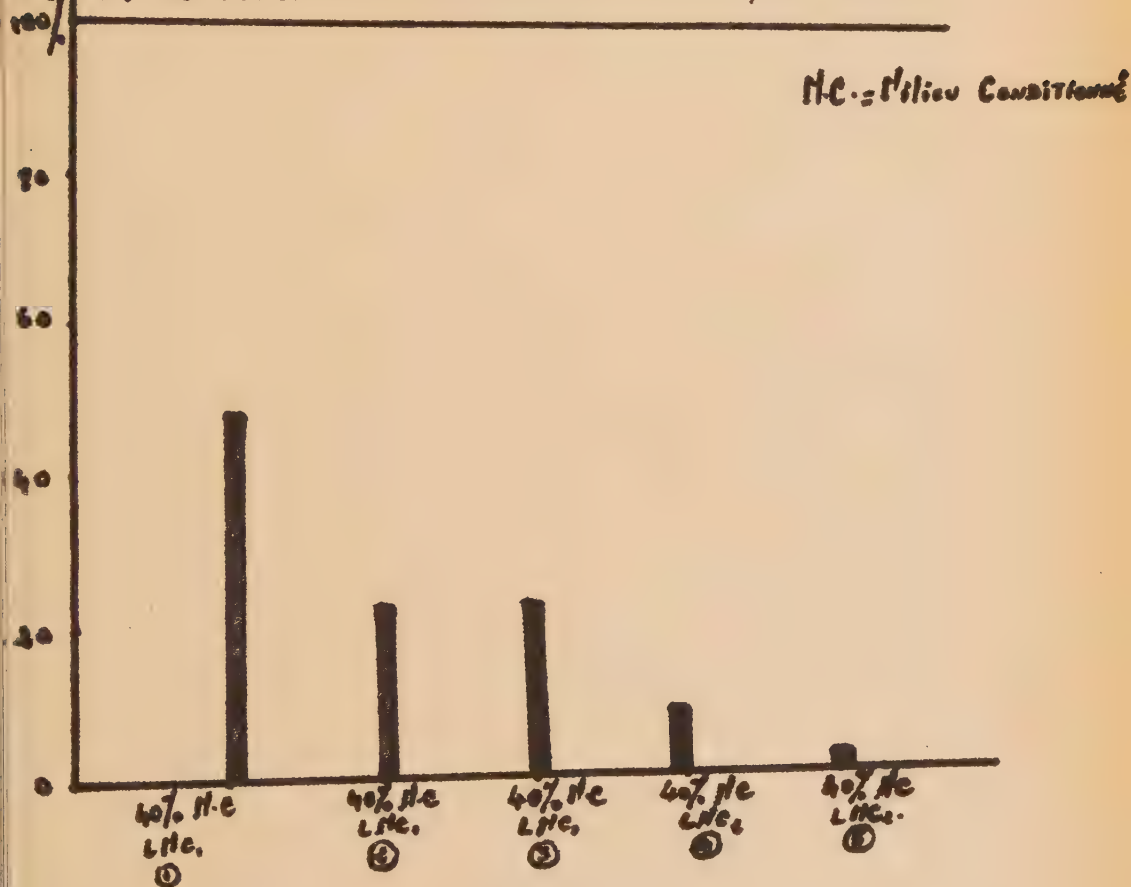
S.L.M. : sous-couche de leucocytes normaux.

S.C.L.M.C. : sous-couche de L.M.C.

TABLEAU III

Colonies  
par rapport à  
normale.

N. de colonies obtenues avec une s/c normale.



Inhibition de la formation de colonies en agar à partir de cellules médullaires normales humaines par des milieux conditionnés obtenus à partir de cellules circulantes de malades atteints de L.M.C. en phase régulière (L.M.C.1) ou en phase "modifiée" (L.M.C.2).



colonies en agar des cellules médullaires normales, puisque l'inhibition est de 35 %, à 50 % pour 0,5 % de sérum ajouté dans le milieu de culture.

Le TABLEAU V : La capacité d'adhérence au verre est très diminuée pour les monocytes de L.M.C., puisqu'à la 6ème heure on n'obtient que 37 % de monocytes sur lame de verre, et 30 % à la 24ème heure, contre 90 % de monocytes normaux à la 6ème heure et 80 % à la 24ème heure.

o . . . .  
o o

T A B L E A U V

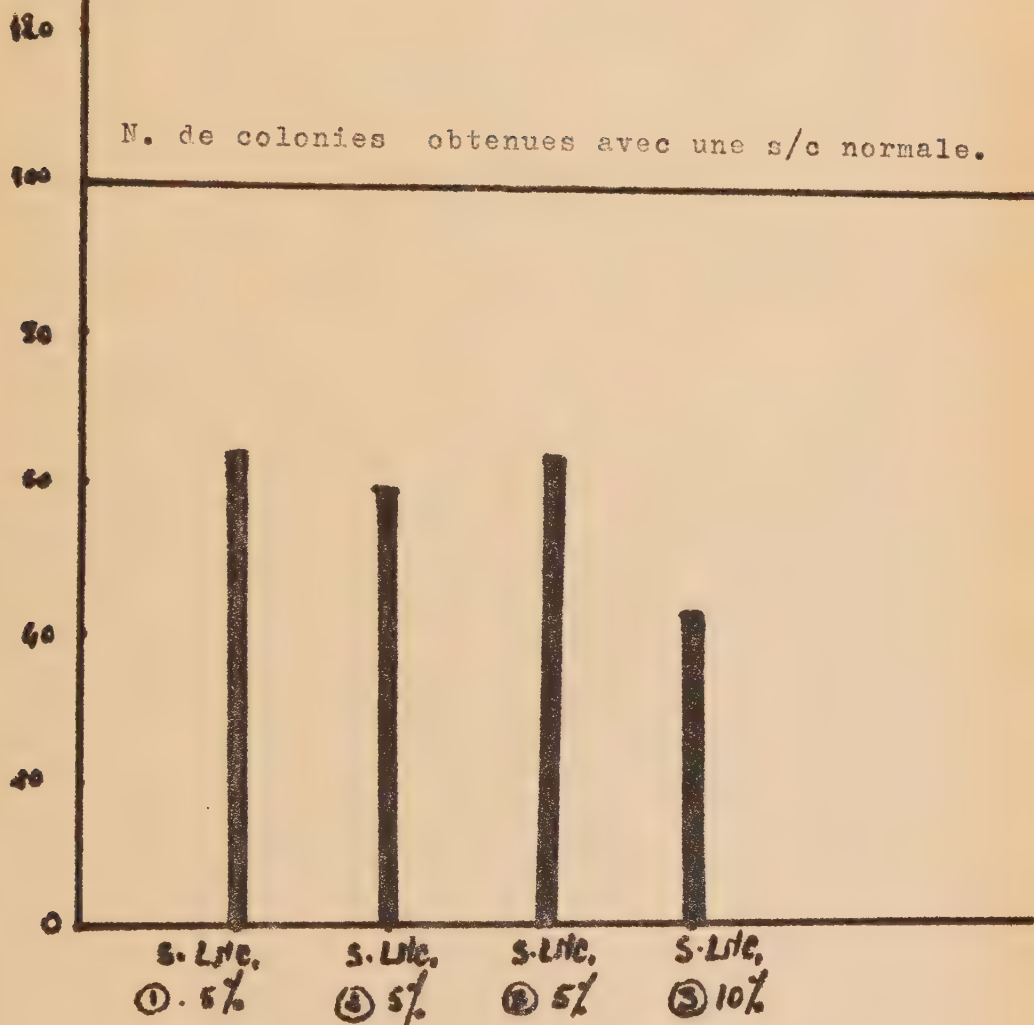
ETUDE DES MONOCYTES DE L.M.C. ;  
ADHERENCE AU VERRE  
(CULTURE EN TUBE DE LEIGHTON)

|                  | N. CELLULES<br>mises en<br>culture | %<br>MONOCYTES | N. MONOCYTES<br>mis en<br>culture | % MONOCYTES<br>sur lame de<br>verre |
|------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| LMC <sub>1</sub> | 14.10 <sup>6</sup> cell.           | 4 %            | 560.000                           | 37 %<br>à la 6e heure               |
| NORMAL           | 4.10 <sup>6</sup>                  | 6 %            | 240.000                           | 90 %<br>à la 6e heure               |
| LMC <sub>1</sub> | 12.10 <sup>6</sup>                 | 2 %            | 240.000                           | 30 %<br>à la 24e heure              |
| NORMAL           | 4.10 <sup>6</sup>                  | 6 %            | 240.000                           | 80 %<br>à la 24e heure              |

TABLEAU IV

% de col.  
par rapport à  
la normale.

S.L.M., 1

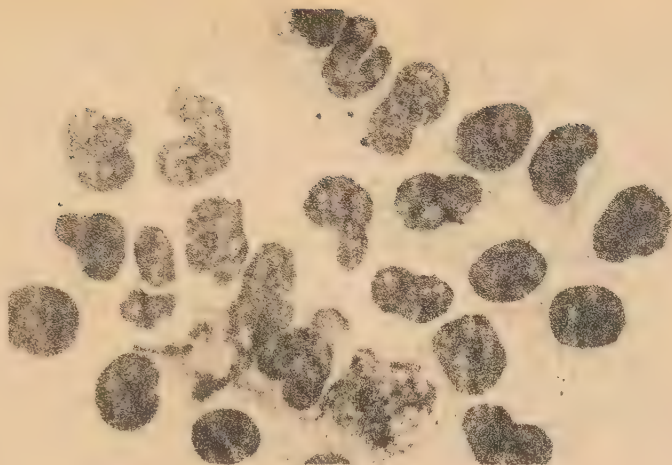


Pourcentage d'inhibition de la formation des colonies à partir de cellules médullaires normales par des sérums de malades atteints de L.M.C. en phase régulière.

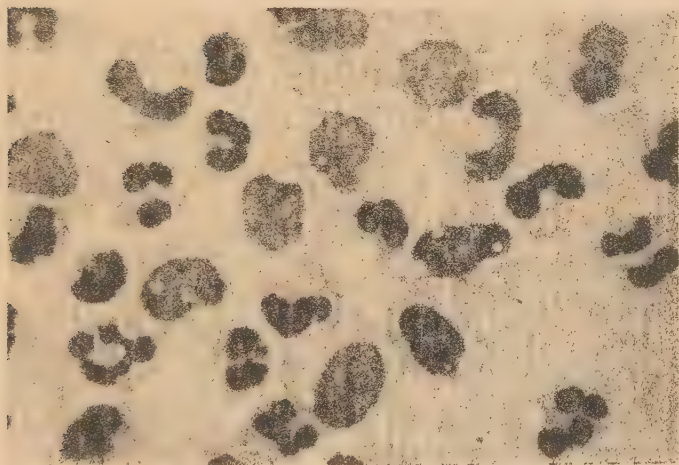
Dans tous les cas la stimulation de la croissance était réalisée par une s/c de leucocytes humains normaux. Noter qu'avec le sérum 3 l'effet inhibiteur augmente avec la concentration.



MONOCYTES  
NORMAUX  
en tube de  
LEIGHTON



MONOCYTES  
de L.M.C.  
EN TUBE DE  
LEIGHTON





## DISCUSSION

\*\*\*\*\*

La technique de culture en agar a permis de progresser dans la compréhension de la granulopoïèse. La croissance in vitro des CFU/a de la moelle osseuse nécessite la présence d'un facteur de stimulation qu'on appelle Colony Stimulating Factor (C.S.F.). D'après de nombreuses expériences, ce CSF paraît comme un véritable facteur positif de la régulation de l'hématopoïèse.

Par ailleurs, de nombreux essais réalisés dans différents laboratoires ont montré la possibilité d'obtenir, sous l'action du C.S.F., des colonies in vitro normalement différenciées, à partir de cellules médullaires de leucémies myéloïdes aiguës. A partir des échantillons de sang et de moelle osseuse de malades en crise blastique de L.M.C. avant tout traitement, il n'est jamais possible d'obtenir une croissance et une différenciation des CFU/a in vitro.

Ainsi, trois points d'étude pourraient être envisagés à partir de ces premiers résultats, dans le but d'essayer de définir, par comparaison avec des systèmes normaux, l'altération progressive, au cours d'une leucémie myéloïde chronique, des taux de facteurs positifs et négatifs sériques de la régulation de l'hématopoïèse, de leur relation avec les modalités de sécrétion par les cellules circulantes, et enfin de l'altération de la cellule souche, soit progressivement altérée, soit rapidement remplacée par un clone de cellules leucémiques non contrôlables.

= En phase régulière de la maladie, le taux de formation des colonies en agar est variable d'un malade à l'autre.

1°)- On note une augmentation des CFU/a dans le sang circulant : l'éventail s'étend de 10 à 576 colonies pour  $2.10^5$  cellules, c'est-à-dire que le nombre de CFU/a circulants est compris entre 1/20.000 et 1/347 cellules. Dans un sang humain normal, le taux de CFU/a est de 1/330.000.

L'augmentation de CFU/a des malades atteints de L.M.C. est donc très significative par rapport aux sujets normaux. L'élément frappant de ces résultats est la variation extrême d'un malade à l'autre du nombre de colonies obtenues. Cependant, il n'existe pas de corrélation entre le taux de leucocytes circulants, la formule morphologique de la myélémie et le nombre de CFU/a. Enfin, il n'y a pas de caractère évolutif particulier en relation avec la formation des colonies in vitro.

Un seul point mérite d'être noté concernant le malade N° 5 (Voir TABLEAU I), qui a présenté un nombre élevé de CFU/a circulants et où la sensibilité au traitement a été très grande, puisqu'un état de rémission complète est obtenu après 15 jours de traitement par 1 g/jour d'hydréa. Cet état persiste 9 mois après le début.

Cette augmentation du taux de CFU/a circulants se voit aussi chez des malades atteints de myélosclérose, et elle progresse avec l'évolution de la maladie (CHERVENICH).

Il paraît simple de rapporter ce passage anormal des cellules souches dans le sang, à une anomalie du stroma médullaire ou au développement des foyers ectopiques d'hématopoïèse. Dans la leucémie myéloïde chronique, la fréquence d'une myélosclérose reconnaissable histologiquement est faible. Chez 3 malades où un examen histologique a pu être fait, il

n'existe pas de myélofibrose.

2°)- En l'absence de toute stimulation de la croissance des cellules in vitro, 3 malades ont présenté une formation spontanée de colonies. Il est important de noter que le taux de formation de colonies est alors très significativement inférieur au taux de formation de colonies dans les conditions de stimulation normale. Cette formation spontanée de colonies peut répondre à deux mécanismes :

a)- Les cellules souches sont anormales et leur prolifération non contrôlable s'extériorise in vitro. Ce phénomène est connu et utilisé dans le clonage de cellules clonogéniques des tumeurs solides ; dans ces cas, les colonies sont extensives et ne présentent jamais de phénomène de maturation cellulaire. Dans cette hypothèse, on pourrait s'attendre à une évolution plus rapide de la maladie. Or, les 3 malades ont présenté une évolution régulière d'une leucémie myéloïde chronique sensible à la chimiothérapie conventionnelle. Les cellules prélevées à partir de ces colonies présentent une maturation et une morphologie normales. (PHOTO)

b)- Ou alors, les conditions de stimulation existent dans le sang de ces malades.

Il peut s'agir d'une sécrétion de CSF par les cellules monocytoïdes présentes dans le sang circulant. Le taux de monocytes en valeur relative est pourtant souvent inférieur au taux observé dans le sang d'un sujet normal. Dans le cadre de cette hypothèse, une captation de CSF par les cellules souches, avant leur mise en culture, peut rendre compte d'une croissance et d'une différenciation in vitro. Il a été démontré par METCALF qu'il n'y a jamais de formation spontanée de colonies à partir de cellules médullaires de souris, mais qu'une ébauche de colonies pourrait être obtenue quand les cellules ont été préalablement mises en contact avec le facteur stimulant.

3<sup>a</sup>) - L'augmentation du recrutement des CFU/a, en présence de CSF chez des malades qui présentent une formation spontanée de colonies, indique que les CFU/a d'une leucémie myéloïde chronique régulière répondent au facteur de régulation de l'hématopoïèse.

= Lors du passage de la leucémie myéloïde chronique régulière en phase préblastique,

on note une disparition de la formation de colonies spontanées et une réduction très sensible du nombre de colonies obtenues après stimulation avec une sous-couche de leucocytes normaux.

= En crise blastique, aucune croissance de colonies n'a été constatée in vitro.

Pour un malade qui a été suivi tout au long des trois phases de sa maladie, les modifications des résultats obtenus sont très significatives : il existe une rupture dans l'évolution purement cellulaire se traduisant par une disparition des CFU/a reconnaissables, l'apparition d'une population blastique peu différenciée et insensible aux facteurs de stimulation.

Il n'est pas possible, sur ces seules données, de trancher entre une prolifération clonale de cellules leucémiques remplaçant peu à peu une population cellulaire normale, et l'altération progressive des cellules souches au cours de la maladie.

Des études cytogénétiques faites sur les colonies en agar des leucémies myéloïdes chroniques ont donné des résultats variables d'un laboratoire à l'autre : pour CHERVENICK, ainsi que CARBONE, certaines colonies sont formées de cellules possédant le chromosome Philadelphie ; d'autres colonies, de cellules à caryotype normal. Par contre, METCALF, CHADDUCK et NANKIN ont trouvé que toutes les colonies en agar sont formées de cellules présentant le Philadelphia.

GRANULOCYTES

et

MACROPHAGES

obtenus à

partir de

colonies au

10ème jour

de culture de

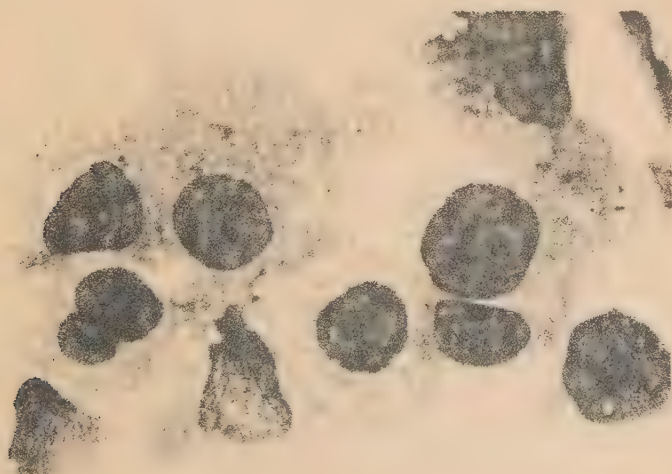
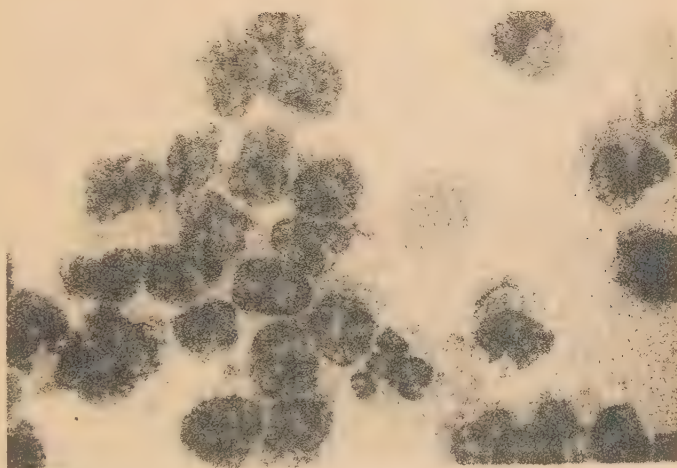
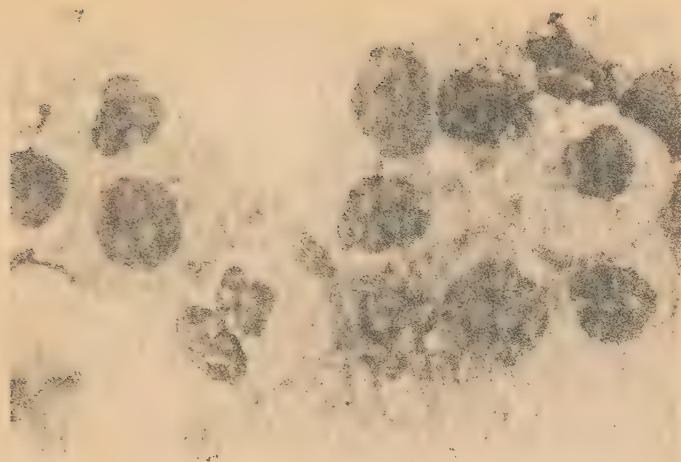
leucocytes

circulants

de L.M.C.

en phase

régulière





Cette variation des résultats pourrait être en relation avec la variation du taux de cellules présentant le  $Ph\ 1$  au moment du prélèvement des échantillons mis en culture. La coexistence de colonies à cellules à  $Ph\ 1^+$  et de colonies à cellules  $Ph\ 1^-$  indiquerait qu'en phase régulière de la L.M.C., il existe deux pools cellulaires, l'un normal, l'autre leucémique, d'importance inégale, variable avec l'évolution de la maladie ; mais tous deux sensibles, in vitro, au facteur de la régulation de l'hématopoïèse.

Par ailleurs, il est de constatation classique qu'une anomalie chromosomique entraîne d'autres anomalies chromosomiques ; dans le cas des LMC, les anomalies secondaires au  $Ph\ 1$ , telle la duplication du  $Ph\ 1$  ou l'apparition d'un isochromosome 17, sont retrouvées lors de la transformation aiguë terminale (de GROUCHY). Dans ces conditions, l'indication du pool cellulaire  $Ph\ 1^+$  devrait permettre d'aboutir à une disparition définitive de la maladie et une récupération d'une hématopoïèse parfaitement normale.

L'étude de la cellule clonogénique leucémique dans la leucémie myéloïde chronique, au vu de ce travail, permet de tirer des conséquences pratiques quant à la surveillance de l'évolution de la maladie, et par la suite la conduite thérapeutique ; le passage d'une phase régulière de la leucémie myéloïde chronique à une phase modifiée annonciatrice de la crise blastique, se traduit par une disparition des cellules formatrices de colonies in vitro dans le sang circulant, par l'apparition d'une population cellulaire anarchique ne répondant plus au facteur de croissance. Ce passage n'a jamais pu être objectivé par l'étude de la morphologie cellulaire sanguine et médullaire.

Ainsi, l'application d'une chimiothérapie intensive, analogue à celle des phases de crise blastique confirmée, pourrait permettre d'augmenter le pourcentage de rémission complète et d'en prolonger significativement la durée.

Quant à l'étude des sérums de sujets atteints

de leucémie myéloïde chronique et des milieux conditionnés obtenus à partir de culture en phase liquide de leurs leucocytes, on ne peut encore tirer de conclusions pratiques, vu le faible nombre de cas. Sérums et milieux conditionnés montrent une activité inhibitrice évidente sur la formation des colonies en agar des cellules médullaires normales. L'activité inhibitrice des sérums de L.M.C. (35 % à 50 %) est inférieure à celle des sérums de sujets normaux, puisque METCALF a trouvé que 98 % de sérums normaux présentent un degré d'inhibition de 50 % à 100 %.

Mais le rôle in vivo de ces inhibiteurs, sérique d'une part, et cellulaire d'autre part, reste à démontrer. Pour cela, il faudrait pouvoir tester systématiquement, dans un laboratoire d'hématologie courante, les sérums de malades atteints de diverses affections hématologiques, et éventuellement les facteurs de sécrétion de leurs leucocytes.

---

## C O N C L U S I O N S

1/- Dans la première phase régulière de la leucémie myéloïde chronique, il a été démontré que les CFU/a (Colony forming units en agar) apparaissent en nombre égal dans le sang et dans la moelle (CHERVENICK).

En dehors de cette anomalie de répartition à l'origine de laquelle on peut incriminer aussi bien un trouble du stroma médullaire, qu'une diffusion anormale à partir de foyers d'hématopoïèse ectopiques, aucune anomalie concernant la prolifération et la capacité de maturation sous l'influence des facteurs réguliers de l'hématopoïèse n'a pu être mise en évidence. Dans tous les cas, l'augmentation des CFU/a circulants a été très significative par rapport aux témoins normaux ; mais cette augmentation varie considérablement d'un malade à l'autre, et ce fait n'apparaît pas être en relation avec une évolution particulière.

Cependant, les éléments circulants de malades atteints de L.M.C. en phase régulière sont incapables de stimuler la croissance des CFU/a provenant de moelle osseuse humaine normale ou de moelle osseuse de souris.

Les essais d'étude de monocytes et de leur capacité de stimulation de la croissance des colonies in vitro, après culture à court terme, n'ont pas encore donné de résultat ; mais il est important de noter que les cellules monocytoides de la leucémie myéloïde chronique semblent avoir une capacité d'adhé-

rence au verre très réduite.

La capacité d'inhibition des sérums de ces malades est analogue à celle des sérums de sujet normal.

2/- La mise en culture des cellules circulantes de malades porteurs d'une leucémie myéloïde modifiée n'a jamais permis d'obtenir de colonies in vitro.

La capacité de stimulation des cellules circulantes est nulle. Les milieux conditionnés, obtenus à partir de ces cellules, montrent une activité inhibitrice.

Si l'ensemble de ces résultats paraît encore incomplet pour proposer une évolution même schématique des anomalies cellulaires qui aboutissent à une phase de leucémie aiguë, il paraît essentiel de noter :

1- l'absence de trouble fondamental des CFU/a à la phase chronique.

2- la disparition complète des CFU/a fonctionnels dans le sang circulant à une période où cliniquement l'évolution paraît chronique.

3/- La perte complète d'activité des CFU/a à la phase de crise blastique, alors qu'on se trouve devant des cellules totalement immatures, souvent analogues aux cellules blastiques des leucémies aiguës myéloïdes.

De multiples expériences en cours permettront peut-être de proposer un schéma d'évolution cellulaire depuis la phase de départ jusqu'à la phase aiguë terminale.

VU & PERMIS D' IMPRIMER :

Le Recteur  
de l'Académie de Paris,  
R. MALLET

Le Doyen de la Faculté  
de Médecine ,

Pr. DELBARRE

Le Président  
de la thèse,

G. MATHE



B I B L I O G R A P H I E

---

BEKKUM (Van D.W.) and DICKE (K.A.) - 1972 - In vitro culture of hemopoietic cells.

BRADLEY T.R. and METCALF D.- The growth of bone marrow cells in vitro.- Aust. J. Exp. Bio. Med., 1966, 44 : 287.

BRADLEY T.R. and SUMNER M.A. - 1968 - Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium.- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 46, 607.

BRADLEY T.R., METCALF D., SUMNER M. and STANLEY R.- Characteristics of in vitro colony formation by cells from hemopoietic tissues.- Hemic cells in vitro, 22-35, 1969.

BROWN C.H. III and CARBONE P.P.- In vitro growth of normal and leukemic human bone marrow.- J. Nat. Cancer Inst. 46, 989, 1971.

CHAN S.H. and METCALF D.- Inhibition of bone marrow colony formation by normal and leukemic human serum.- Nature, 227 : 845, 1970.

CHAN S.H., METCALF D. and STANLEY E.R.- Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation in vitro by bone marrow cells.- Brit. J. Haematol. 20 : 329, 1971.

CHERVENICK P.A. and BOGGS D.R.- Stimulation in vitro by supernatants from incubated human blood cells.- Science 169, 691, 1970.

CHERVENICK P.A. and BOGGS D.R.- Blood 37, 131, 1971.

COWAN D.H., CLARYSSE A., ABU-ZAHRA H., SENN J.S. and Mc CULLOCH E.A.- Ser. Haemat., vol. V, 2, 1972, 179-188.

CUDKOWITZ G. and STIMPFLING J.H.- Science, 147, 1056, 1965.

DICKE K.A.- Bone marrow transplantation after separation by discontinuous albumin density gradient centrifugation.- Thesis Leyden, 1970.

FORSTER R.Jr., METCALF D., ROBINSON W.A. and BRADLEY T.R.- Bone marrow colony stimulating activity in human sera. Results in two independent surveys in Buffalo and Melbourne.- Brit. J. Haemat. 15 : 147-159, 1968.

HASKILL J.S., Mc NEILL T.A. and MOORE M.A.S.- Density distribution analysis of in vitro and in vivo colony forming cells in bone marrow.- J. Cell. Physiol. 75 : 167, 1970.

ICHIKAWA Y., PLUZNICK D.H. and SACHS L. (1966) - In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies.- Proc. nat. Acad. Sci. 56, 488.

ISCOVE N.N., SENN J.S., TILL J.E. and Mc CULLOCH E.A.- Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture : effect of conditioned medium from human leucocytes.- Blood 31, 1, 1971.

LAJTHA L.G., POZZI L.V., SCHOFIELD R. and FOX M. (1969)-

Kinetic properties of haemopoietic stem cells.-  
Cell. Tiss. Kinet. 2 : 39.

Mc CULLOCH E.A. and TILL J.E.- J. Cell. Comp. Physiol.  
61 : 301 (1963).

MANGALIK A. and ROBINSON W.A.- The effect of serum from  
patients with acute granulocytic leukemia on  
granulocyte colony formation in vitro : a search  
of inhibitors.- Proceed. of the Soc. for Exp. Bio.  
and Med., vol. 14, 2, Nov. 1972.

METCALF D., BRADLEY T.R. and ROBINSON W.- Analysis of  
colonies developing in vitro from mouse bone  
marrow cells stimulated by kidney feeder layers  
of leukaemic serum.- J. Cell. Comp. Physiol.  
1967, 69 : 93.

METCALF D., MOORE M.A.S. and WARNER N.L.- Colony  
formation in vitro by myelomonocytic leukemic  
cells.- J. Nat. Cancer Instit. 1969, 93 : 983.

METCALF D.- Studies on colony formation in vitro by  
mouse bone marrow cells. II- Action of colony  
stimulating factor.- J. Cell. Physiol. 76 :  
89, 1970.

METCALF D.- Transformation of granulocytes to macro-  
phages in bone marrow colonies in vitro.- J.  
Cell. Physiol. 77 : 277, 1971.

METCALF D.- Antigen - induced proliferation in vitro  
of bone marrow precursors of granulocytes and  
macrophages.- Immunology 20 : 727, 1971.

METCALF D.- Acute antigen - induced elevation of serum  
colony stimulating factor (CSF) levels.-  
Immunology 1971.

METCALF D. and MOORE M.A.S.- Hemopoetic cells.- North Holland, Amsterdam, 1971.

METCALF D., CHAN S.H., GUNZ F.W., VINCENT P. and RAVICH R.B.M.- Colony stimulating factor and inhibitor levels in acute granulocytic leukemia. - Blood 38 : 143, 1971.

METCALF D.- Inhibition of bone marrow colony formation in vitro by dialysable products of normal and neoplastic haemopoietic cells.- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971.

METCALF D.- The discrimination of leukemic from normal cells.- Biomedecine, 1973, 18, 264-271.

MOORE M.A.S. and METCALF D.- 1970 - Brit. J. Haematol. 18, 279-296.

MORLEY A., RICKARD K.A., HOWARD D. and STOHLMAN F.Jr.-, Studies on the regulation of granulopoiesis. IV- Possible humoral regulation. - Blood : 37 : 14-22, 1971.

PARAN M., ICHIKAWA Y. and SACHS L. (1969) - Feedback inhibition of the development of macrophage and granulocyte colonies. II- Inhibition by granulocytes.- Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 62, 81.

PAUKOVITS W.R.- Control of granulocyte production : separation and chemical identification of a specific inhibitor (Chalone).- Cell Tissue Kinetic (1971) 4, 539-547.

PIKE B.L. and ROBINSON W.A. - Human bone marrow colony growth in agar gel.- J. Cell. Comp. Physiol. 76, 77, 1970.

PLUZNICK D.H. and SACHS L.- J. Cell. Comp. Physiol. 66, 319 (1965).

PLUZNIK D.H. and SACHS L.- The induction of colonies of normal "mast" cells by a substance in conditioned medium.- Exp. Cell. Res. 43, 553; 1966.

ROBINSON W., METCALF D. and BRADLEY T.R.- Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony formation in vitro by mouse bone marrow cells.- J. Cell. Physiol. 69 : 83-92, 1967.

ROBINSON W.A., STANLEY E.R. and METCALF D.- Stimulation of bone marrow colony growth in vitro by human urine.- Blood 33 : 396-399, 1969.

SENN J.S., Mc CULLOCH E.A. and TILL J.E.- Comparison of colony forming ability of normal and leukemic human marrow in cell culture.- Lancet II, 597-598 (1967).

SHADDUCK R.K. and NANKIN H.R.- The Lancet Nov. 13, 1971, p. 1097-1098.

SHERIDAN J.W. and STANLEY E.R., 1971 - Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor.- J. Cell. Physiol. -

STANLEY E.R., ROBINSON W.A. and ADA G.L. (1968) - Properties of the colony stimulating factor in leukemic and normal mouse serum.- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46, 715.

STANLEY E.R. and METCALF D.- The molecular weight of colony stimulating factor (CSF).- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Sci. 137 : 1029, 1971.

TILL J.E. and Mc CULLOCH E.A. - A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.- Radiation Res. 14, 213, 1961.

WU A.A., SIMONOVITCH L., TILL J.E. and Mc CULLOCH  
E.A.- Evidence for relationship between mouse  
hemopoietic stem cells forming colonies in  
culture.- Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 1209,  
1968.

---







